



(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 107 048**

(51) Int. Cl.[6]: C07K 5/10
C07K 5/08
C07K 5/06
A61K 38/07
A61K 38/06
A61K 38/05

(12) TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **93916889.4**
(86) Fecha de presentación : **30.06.93**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0 652 894**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.95**

(54) Título: **Tensioactivos pulmonares peptídicos sintéticos con antioxidantes covalentemente unidos.**

(30) Prioridad: **31.07.92 US 923092**
21.06.93 US 77802

(73) Titular/es: **Merrell Pharmaceuticals Inc.**
2110 East Galbraith Road, P.O. Box 156300
Cincinnati, Ohio 45215-6300, US

(45) Fecha de la publicación de la mención BOPI: **16.11.97**

(72) Inventor/es: **McLean, Larry R. y Edwards, J. Vincent**

(45) Fecha de la publicación del folleto de patente: **16.11.97**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 107 048 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art° 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Esta invención se refiere a la síntesis de una serie de polipéptidos de 3 a 4 aminoácidos que tienen antioxidantes covalentemente unidos al péptido ya sea directamente o a través de una región terminal de unión. Estos péptidos modificados son útiles como tensioactivos pulmonares sintéticos que tienen antioxidantes útiles formando parte estructural del péptido. También se describe la preparación de mezclas de estos polipéptidos con lípidos, el método para su producción y composiciones farmacéuticas que son eficaces en el tratamiento del síndrome de disnea respiratoria de los mamíferos.

Antecedentes de la invención

Los pulmones están en un equilibrio delicado entre los oxidantes tóxicos y las actividades protectoras de los sistemas de defensa antioxidantes. Un desequilibrio en este sistema, ya sea por un incremento de los agentes oxidantes o una disfunción de los sistemas de defensa antioxidantes protectores, puede conducir a episodios patofisiológicos en los pulmones causando disfunción pulmonar. Un tipo de disfunción pulmonar a la que puede contribuir un incremento de los agentes oxidantes es el síndrome de disnea respiratoria (SDR).

El síndrome de disnea respiratoria infantil es causa de muerte en los primeros 28 días de vida. El SDR infantil afecta a 1 de cada 100 lactantes en todo el mundo y aproximadamente el 10 por ciento muere. El síndrome raramente ocurre en recién nacidos a término pero generalmente está relacionada con inmadurez y bajo peso al nacer (menos de 2 kg). El SDR del adulto presenta un cuadro clínico y patofisiología similares a los de la enfermedad infantil y generalmente se trata en unidades de cuidados intensivos. La enfermedad adulta tiene diversas etiologías, muchas de ellas resultantes de ataques pulmonares, tales como infecciones difusas, aspiración del contenido gástrico, inhalación de sustancias irritantes y toxinas y edema pulmonar debido a focos tales como sobredosis de narcóticos.

El SDR está correlacionado con una ausencia o disfunción del tensioactivo pulmonar que reviste los alvéolos pulmonares donde ocurre el intercambio de gases y ha sido asociado con los radicales libres concentrados en el oxígeno de los pulmones o cavidades pulmonares, conocidos como oxidantes, tales como los radicales superóxido, radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno que puede generar radicales hidroxilo, y peróxidos de lípidos, que han estado implicados en lesiones celulares (Heffner y col., *Am. Rev. Respir. Dis.* 104: 531 -554, 1989); (Halliwell, *FASEB J.* 1: 358-364, 1987).

En la solicitud de patente estadounidense n° de serie 07/789.918, presentada el 4 de noviembre de 1991, que se incorpora aquí como referencia, se han descrito tensioactivos pulmonares sintéticos de polipéptidos más grandes que tienen restos antioxidantes. Sin embargo, la presente invención proporciona un tensioactivo pulmonar sintético eficaz que tiene propiedades antioxidantes y basado en péptidos más cortos de 3-4 aminoácidos, que tienen el poder de inhibir la oxidación de compuestos susceptibles para dar oxidantes. Los tensioactivos pulmonares acortados proporcionan un medio más eficaz y más rentable para producir agentes terapéuticos. La presente novedad de la invención radica en el poder de reducir eficazmente el péptido a 3-4 aminoácidos con retención de las propiedades tensioactivas y liberar eficazmente el péptido unido a un antioxidante covalentemente unido.

Algunos preparados de tensioactivos pulmonares sintéticos tienen añadidos agentes terapéuticos tales como Vitamina E al preparado tensioactivo como un componente separado (patente estadounidense n° 4.765.987; publicación de PCT n° WO 90/11768; publicación de PCT n° WO 90/07469). Sin embargo, en la presente invención los antioxidantes no son un componente separado sino que se incorporan realmente en un polipéptido. Una ventaja de incorporar el antioxidante en el polipéptido es que en lugar de tener una mezcla de tres componentes (lípido, polipéptido y antioxidante), es asequible una mezcla de dos componentes. Esto puede ser una ventaja significativa en los ensayos de eficacia de un producto farmacéutico comercializable en que deben ser ensayadas una gama de dosificaciones y formulaciones para cada componente. Además, una formulación de dos componentes es más fácil de fabricar.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden utilizar por separado en mezclas con lípido o combinados en mezclas de lípido en donde el polipéptido constituye un componente minoritario de la mezcla de tensioactivo. La composición de la presente invención se puede preparar con alta pureza y de modo normalizado ya que es una mezcla definida de componentes sintéticos. Además, los componentes no se derivan de fuentes animales, lo que minimiza el riesgo de contaminación por virus y bacterias.

Para desarrollar un modelo para los péptidos de tres y cuatro restos, se utiliza una representación de rueda helicoidal de un péptido ambipático en hélice a de diez restos (para la descripción del péptido en hélice a ambipático, véase McLean, L.R. y col., *Biochem.*, 1991, 30, 31). Cuando se mira desde abajo

el cuerpo de la hélice α, las cadenas laterales de los restos indican una cara hidrofóbica y una cara hidrofílica sobre la hélice. Un péptido de cuatro restos representa una sola vuelta de esta hélice a con la cara hidrofóbica y la cara hidrofílica requeridas presentes. Un péptido de tres restos representa una vuelta apretada de la hélice α con las caras hidrofóbica e hidrofílica todavía presentes.

Compendio de la invención

La presente invención comprende tensioactivos pulmonares sintéticos que comprenden un complejo de un polipéptido y lípidos, donde el polipéptido tiene la fórmula 1 siguiente:

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}Y \qquad 1$$

o uno de sus isómeros ópticamente activos o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; en donde

A_1 es un enlace o un aminoácido cargado negativamente elegido entre Glu o Asp;

A_2 es un aminoácido hidrofóbico elegido entre Trp, Tyr, Phe, His, Val, Leu o Ile;

A_3 es Aib, Glu, Gln, Leu, Ala, Orn o un enlace; y

A_4 es un aminoácido cargado positivamente elegido entre Lys, Arg o His;

X tiene la fórmula Da o Db:

donde B_1 es B, -C(O)-, -B-C(O)-, -C(O)-NH-B-C(O)-; y B es un enlace, alquileno C_{1-16} o alquenileno C_{2-16}; y donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 y R_7 en cada caso son independientemente alquilo C_{1-6};

Y es un sustituyente del carboxilo de A_4 elegido entre grupos hidroxi, amino, alquilamino y alcoxi; y

donde, cuando A_3 es un enlace, A_1 y A_2 se pueden intercambiar.

Además, la presente invención se refiere a tensioactivos pulmonares sintéticos que comprenden un complejo de un polipéptido y lípidos, donde el polipéptido tiene la fórmula 2 siguiente:

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}Y \qquad 2$$

o uno de sus isómeros ópticamente activos o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; en donde

A_1 es un enlace o Glu;

A_2 es Trp o Glu;

A_3 es Aib, Glu, Gln, Leu, Ala u Orn; y

A_4 es Lys;

X tiene la fórmula Da o Db:

donde B_1 es B, -C(O)-, -B-C(O)-, -C(O)-NH-B-C(O)-; y B es un enlace, alquileno C_{1-16} o alquenileno C_{2-16}; y donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 y R_7 en cada caso son independientemente alquilo C_{1-6}; e

Y es un sustituyente del carboxilo de A_4 elegido entre grupos hidroxi, amino, alquilamino y alcoxi.

Además, los péptidos de esta invención se pueden asociar con un lípido que comprende uno o más del tipo asociado con tensioactivo pulmonar natural.

Estos complejos de polipéptido-lípido y sus composiciones farmacéuticas son útiles en el tratamiento de síndrome de disnea respiratoria de los mamíferos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación en rueda helicoidal de un tensioactivo peptídico de diez restos utilizado para desarrollar un modelo para péptidos cortos. La vista es desde abajo del cuerpo de la hélice y las cadenas laterales de los restos están indicadas en sus posiciones respecto del eje de la hélice. La cara hidrofóbica incluye los restos a la derecha en el dibujo que son Trp^8, Leu^1, Leu^5, Leu^9, Leu^2 y Leu^6. La cara hidrofílica incluye los restos cargados Lys^4, Glu^7, Glu^3 y Lys^{10}.

La Figura 2 es un ejemplo de un antioxidante tetrapeptídico diseñado sobre la base de una sola vuelta de la proyección de la rueda helicoidal del péptido de diez restos mostrado en la Figura 1. La cara hidrofóbica del péptido de la Figura 1 ha sido reemplazada por Trp^2, Ala^3 HBB-Aoc que constituyen una cara hidrofóbica suficiente para anclar el péptido al lípido. La cara cargada hidrofílica ha sido reemplazada por Glu^1 y Lys^4.

Breve descripción de las tablas

La Tabla 1 presenta los resultados del análisis de aminoácidos de los péptidos sintetizados.

La Tabla 2 presenta los resultados de los experimentos de presión-volumen que muestran la eficacia de los compuestos en el modelo pulmonar de rata adulta.

Descripción detallada de la invención

En toda esta memoria se utilizan las siguientes abreviaturas vulgares de los aminoácidos naturales:

Ala o A - alanina

Val o V - valina

Leu o L - leucina

Ile o I - isoleucina

Phe o F - fenilalanina

Trp o W - triptófano

Met o M - metionina

Ser o S - serina

Tyr o Y - tirosina

Asp o D - ácido aspártico

Glu o E - ácido glutámico

Gln o Q - glutamina

Thr o T - treonina

Gly o G - glicina

Lys o K - lisina

Arg o R - arginina

Asn o N - asparagina

Nle - norleucina

Orn - ornitina

hArg - homoarginina

Nva - norvalina

Aib - ácido aminoisobutírico.

Los aminoácidos naturales, salvo la glicina, contienen un átomo de carbono quiral. Salvo indicación especifica en contrario, los aminoácidos ópticamente activos, referidos aquí, son los de configuración L. Una vez que el resto antioxidante de la presente invención es añadido al péptido, se pueden formar estereoisómeros. La presente invención comprende mezclas de estos estereoisómeros así como el estereoisómero aislado. Como es habitual, la estructura de los péptidos aquí escrita es tal que el extremo amino-terminal está al lado izquierdo de la cadena y el extremo carboxi-terminal está al lado derecho de la cadena.

Cuando dos aminoácidos se combinan para formar un péptido a través de un enlace amido típico, se desprende una molécula de agua y lo que queda de cada aminoácido se denomina "resto". El enlace amido también puede ocurrir cuando X se une a un aminoácido subsiguiente o a un isóstero de enlace amido. Por lo tanto, un resto es un aminoácido que carece de un átomo de hidrógeno del grupo amino terminal y que carece del grupo hidroxilo del grupo carboxilo terminal. Utilizando la terminología aceptada, un trazo (-) (que indica pérdida de una molécula de agua) en frente de un código de tres letras para un aminoácido o derivado de aminoácido indica el enlace amido de un resto.

"Alquilo" en el sentido aquí utilizado, representa un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada tal como metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, t-butilo, sec-butilo, isopentilo, 1-metilbutilo, etc., dependiendo del número de átomos de carbono especificados. "Acilo" como se utiliza aquí representa un radical formado a partir de un ácido orgánico por eliminación de un grupo hidroxi; la fórmula general es RCO- donde R puede ser un radical hidrocarbonado alifático, alicíclico o aromático, o hidrógeno (grupo formilo). El grupo R puede ser sustituido. Un ejemplo de un grupo acilo es succínilo.

En el sentido aquí utilizado, la expresión "aminoácido hidrofóbico" representa un resto no polar con una cadena lateral hidrocarbonada alifática tal como Val, Leu o Ile; o un resto no polar con un grupo aromático tal como Phe, Tyr, Trp o His.

En el sentido aquí utilizado, la expresión "aminoácido cargado negativamente" representa un resto polar con una cadena lateral hidrofílica ácida tal como Glu o Asp.

En el sentido aquí utilizado, la expresión “aminoácido cargado positivamente” representa un resto polar con una cadena lateral hidrofílica básica tal como Lys, Arg o His.

Los péptidos, donde X no ha sido modificado funcionalmente por el antioxidante designado, se pueden sintetizar por cualquier método adecuado tal como un procedimiento secuencial en fase sólida, como se describe más adelante. Se obtienen grupos Markush preferidos cuando R_1, R_2, R_6 y R_7 son cada uno t-butilo, y cada uno de R_3, R_4 y R_5 son metilo. Se prefiere Da sobre Db y B es preferiblemente -C(O)-NH-B-C(O) donde B es un alcano C_8;

X se denomina aquí “resto antioxidante” ya que se cree que X es aquella porción que confiere propiedades antioxidantes al polipéptido. Sin embargo, se entenderá que X puede tener terminales de unión al polipéptido de modo que cuando se describen los restos antioxidantes unidos al polipéptido, también incluyen los terminales de unión apropiados, v.g., B, -C(O)-, B-C(O)-, C(O)-NH-B-C(O)-, etc.

Hay muchas maneras de formar X. Por ejemplo, los derivados de aminoácido se pueden acilar con un agente acilante formado a partir de compuestos antioxidantes. Para ser un agente acilante, los compuestos antioxidantes pueden formar, por ejemplo, un anhídrido simétrico o un éster activo, v.g., éster de N-hidroxibenzotriazol (éster de HOBT). Después, el agente acilante se expone al nucleófilo funcional desprotegido para que tenga lugar la reacción. Esto se hace preferiblemente por síntesis de péptidos en fase sólida mientras el aminoácido que recibe el resto antioxidante es parte del péptido unido a la resina.

Los aminoácidos individuales también pueden ser modificados antes de su incorporación en el péptido, por ejemplo, por esterificación, alquilación reductiva, etc. Otras modificaciones de aminoácidos y de derivados de aminoácidos que contienen grupos funcionales son bien conocidas en la técnica.

Ejemplos preferidos de compuestos antioxidantes que resultan ser útiles en la reacción con aminoácidos o derivados de aminoácidos en la presente invención son los siguientes:

1) HBB = ácido 3,5-di-t-butil-4-hidroxibenzoico

2) HBP = ácido 3-(3’,5’-di-t-butil-4-hidroxifenil)-propiónico

3) HBC = ácido 3,5-di-t-butil-4-hidroxicinámico

4) HBA = ácido 2-(3’,5’-di-t-butil-4-hidroxifenil)-acético

5) di-HBA = ácido 2,2-di-(3’,5’-di-t-butil-4-hidroxifenil)-acético

6) Trl = ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2 -carboxílico -conocido también como Trolox

Preferiblemente se utilizan HBB, HBP, HBC, HBA, di-HBA y Trl cuando el grupo funcional es un grupo alcohólico o un grupo amino. Dentro del grupo de tensioactivos unidos por un terminal, se puede elegir un agrupamiento preferido para formar un agrupamiento más preferido, tal como HBB y Trl.

Los compuestos antioxidantes anteriores son asequibles en el mercado o su síntesis es conocida en la técnica, v.g., el ácido 3,5-di-t-butil-4-hidroxifenilacético está descrito en Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim., 358, 1965, y el 3,5-di -t-butil-4-hidroxibenzaldehído está descrito en J. Org. Chem., 22, 1333, 1957. En general, en la presente invención se puede utilizar cualquier compuesto antioxidante que (1) se pueda unir al polipéptido de la presente invención, (2) presente actividad antioxidante mientras está unido al polipéptido y (3) permita que el polipéptido actúe como se describe aquí.

Trl-Glu - representa una molécula que tiene un enlace peptídico formado entre trolox y un resto glutamilo; donde el trolox está unido al grupo α-amino de un resto de ácido glutámico como se muestra a continuación:

Como se indica por el ejemplo Trl-Glu, el resto antioxidante, en este caso donde X = Db y B = un enlace, junto con un grupo carbonilo (C(O)-) puede unirse al extremo α-amino del polipéptido para formar Db-C(O)-A_1-A_2-A_3-A_4-Y.

Los polipéptidos de esta invención se pueden preparar por diversos procedimientos fácilmente conocidos por los expertos en la técnica tales como química en fase de solución. Un método preferido es el procedimiento secuencial en fase sólida que puede utilizar métodos automáticos tales como el sintetizador de péptidos ABI. En el procedimiento secuencial en fase sólida, ocurren las siguientes etapas: (1) un primer aminoácido, que tiene un grupo α-amino protegido, se une a una resina soporte; (2) el grupo carboxílico de un segundo aminoácido, que tiene un grupo α-amino protegido, se activa; (3) el primer aminoácido se desprotege con un reactivo que permita que el primer aminoácido permanezca unido a la resina; y (4) ocurre la copulación entre el grupo α-amino del primer aminoácido y el grupo carboxílico activado del segundo aminoácido. Estas etapas se repiten con nuevos restos de aminoácido, lo que permite la formación del péptido. Cuando se ha formado la longitud deseada de péptido, el péptido de puede modificar con un resto antioxidante apropiadamente copulado antes de ser separado de la resina, desprotegido y aislado. Alternativamente el péptido protegido se puede separar selectivamente de la resina y el resto antioxidante se copula al péptido antes de separar los grupos protectores y aislarlo.

La resina soporte empleada puede ser cualquier resina adecuada empleada convencionalmente en la técnica para la preparación en fase sólida de polipéptidos, tales como un poliestireno que ha sido reticulado con 0,5 a aproximadamente 3 por ciento de divinilbenceno, que ha sido clorometilado o hidroximetilado para proporcionar sitios para la formación de éster con el aminoácido α-amino-protegido introducido inicialmente. Otras resinas soporte adecuadas son pMHBA (Peptide International, Lousiville, Ky), RINK (Calbiochem, LaJolla, Ca) y Sasrin (Biochem, Philadelphia, Pa). La resina Sasrin requiere un ciclo ABI especial para cargar el primer aminoácido, que se describe en el manual del usuario del sintetizador de péptidos ABI. El primer aminoácido, que tiene un grupo α-amino protegido, se une a la resina como se describe en el manual del usuario del sintetizador de péptidos modelo 430A de Applied Biosystems, incorporado aquí completamente.

Los métodos preferidos para activar cada aminoácido añadido a la cadena peptídica unida incluyen la formación de un anhídrido simétrico o éster activo de cada α-amino ácido añadido, que ha sido protegido apropiadamente. Por ejemplo, un aminoácido α-amino protegido se puede someter a reacción con diciclohexilcarbodiimida (DCC) en presencia de diclorometano (DCM) para formar el anhídrido simétrico. Alternativamente, se puede formar un éster activo de HOBt disolviendo Boc-aminoácido (t-butiloxicarbonil-aminoácido) y HOBT en DCC y enfriando, añadiendo DCC adicional y calentando la solución a temperatura ambiente. Después se añade esta solución a la resina con el aminoácido unido. Este método de activación para formar agentes acilantes también se puede utilizar para los compuestos antioxidantes.

Si hay otros grupos funcionales presentes además del grupo α-amino, generalmente esos grupos tendrán que ser protegidos. Por lo general, el grupo α-amino y cada uno de los grupos funcionales de las cadenas laterales se pueden proteger con diferentes grupos protectores de manera que un grupo protector puede ser eliminado sin eliminar los demás grupos protectores.

Entre las clases de grupos protectores de α-amino contemplados para uso con la presente invención están: (1) grupos protectores de tipo acilo tales como: formilo, trifluoroacetilo, ftalilo, toluenosulfonilo (tosilo), bencenosulfonilo, nitrofenilsulfenilo, tritilsulfenilo, o-nitrofenoxiacetilo y γ-clorobutirilo; (2) grupos protectores de tipo uretano aromático tales como benciloxicarbonilo y benciloxicarbonilo sustituido tales como p-clorobenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, p-

metoxibenciloxicarbonilo, 1-(p-bifenil)-1-metiletoxicarbonilo, α,α-dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo y benzhidriloxicarbonilo; (3) grupos protectores de tipo uretano alifático tales como t-butiloxicarbonil (Boc), diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo y aliloxicarbonilo; (4) grupos protectores de tipo cicloalquiluretano tales como ciclopentiloxicarbonilo o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc); (6) grupos protectores de tipo alquilo tales como trifenilmetilo (tritilo) y bencilo; (7) grupos trialquilsilano tales como trimetilsilano.

Sin embargo, la elección del grupo protector de α-amino dependerá de la resina utilizada, el grupo funcional del sitio diana, los demás grupos funcionales presentes en el polipéptido y de si el derivado de aminoácido X puede resistir el desanclaje de la resina con un reactivo de corte. Por ejemplo, para preparar HBB-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2, (SEQ ID N°: 1), se utiliza una resina pMBHA, que produce un grupo amino C-terminal, y el péptido se construye aplicando la química t-Boc convencional a un sintetizador de péptidos ABI430A. El resto HBB se puede introducir como un éster activo de HOBT con el fin de unir HBB al grupo N-α-amino diana de ácido glutámico. Se puede utilizar ácido fluorhídrico anhidro (HF) para desanclar el péptido de la resina y al mismo tiempo eliminar los grupos protectores restantes.

La elección de la combinación apropiada de grupos protectores y reactivos para eliminar selectivamente grupos protectores es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, véase M. Bodanszky, PEPTIDE CHEMISTRY, A PRACTICAL TEXTBOOK, Springer-Verlag (1988); J. Stewart y col., SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, 2ª edición, Pierce Chemical Co. (1984).

Cada aminoácido protegido o secuencia de aminoácidos protegida se introduce en el reactor de fase sólida en un exceso de aproximadamente cuatro veces y la copulación se lleva a cabo en presencia de un agente copulante tal como en un medio de dimetilformamida:cloruro de metileno (1:1) o en dimetilformamida sola o cloruro de metileno solo. En casos en los que ocurre copulación incompleta, el procedimiento de copulación se repite antes de la separación del grupo protector de α-amino, previamente a la copulación del siguiente aminoácido en el reactor de fase sólida. El éxito de la reacción de copulación en cada etapa de la síntesis se verifica por la reacción de ninhidrina como describe E. Kaiser y col., *Analyt. Biochem.* 34, 595 (1970).

Una vez obtenida la secuencia deseada de aminoácidos, el péptido se separa de la resina utilizando cualquier reactivo apropiado que no afecte adversamente al polipéptido. Por ejemplo, se puede utilizar HF anhidro que contiene 5 % de anisol y 5 % de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1 % para desanclar el polipéptido de una resina PMBHA.

Los polipéptidos de Fórmula 1 pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con cualquier ácido no tóxico, orgánico o inorgánico. Acidos inorgánicos ilustrativos que pueden formar sales adecuadas incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico y sales metálicas ácidas, tales como monohidrógeno-ortofosfato de sodio e hidrógeno-sulfato de potasio. Acidos orgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen ácidos mono, di, y tricarboxílicos. Como ejemplos de estos ácidos, se pueden citar ácido acético, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, glutárico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroximaleico, benzoico, hidroxibenzoico, fenilacético, cinámico, salicílico, 2-fenoxibenzoico y ácidos sulfónicos, tales como ácido metanosulfónico y ácido 2-hidroxietanosulfónico. Entre las sales del resto de aminoácido carboxi terminal, se incluyen las sales de ácido carboxílico no tóxicas formadas con cualquier base orgánica o inorgánica adecuada. Ilustrativamente, estas sales incluyen las de metales alcalinos como, por ejemplo, sodio y potasio; metales alcalinotérreos, tales como calcio y magnesio; metales ligeros del Grupo IIIA, incluyendo aluminio; y aminas orgánicas primarias, secundarias y terciarias como, por ejemplo, trialquilaminas, incluyendo trietilamina, procaína, dibencilamina, 1-etenamina, N,N'-dibenciletilendiamina, dihidroabietilamina, N-(alquil inferior)piperidina y cualquier otra amina adecuada.

Los fosfolípidos de los complejos de proteína-fosfolípido de esta invención pueden ser cualquier fosfolípido y este término, en el sentido aquí utilizado, incluye los fosfoglicéridos y los esfingolípidos. Los fosfoglicéridos son aquellos diésteres de ácido graso de glicerol en los que el grupo hidroxi restante, un grupo hidroxi terminal, del resto de glicerol forma un éster con ácido fosfórico. Corrientemente el resto de ácido fosfórico de los fosfoglicéridos forma un segundo éster con un alcohol tal como etanolamina, serina, colina o glicerol. Los esfingolípidos son aquellos monoésteres de ácido graso de esfingosina o dihidroesfingosina en los que el grupo hidroxi de la posición 1 forma un éster de colina de ácido fosfórico. Los lípidos preferidos de los complejos proteína-fosfolípido de esta invención comprenden dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), moléculas de fosfatidilcolina que contienen cadenas aciladas de otras longitudes y grados de saturación (PC), cardiolipina (CL), fosfatidilgliceroles (PG), fosfatidilserinas (PS), ácidos grasos (FA) y

triacilgliceroles (TG). DPPC constituye el componente principal de la mezcla de tensioactivo pulmonar, mientras que PC, CL, PG, PS, FA y TG constituyen componentes minoritarios. Acidos grasos adecuados para uso en los fosfolípidos de esta invención son ácidos carboxílicos de cadena larga (que tienen generalmente ocho o más átomos de carbono), típicamente no ramificados. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados. Acidos grasos representativos son ácido láurico, mirístico, palmítico y oleico.

Los preparados farmacéuticos del polipéptido o de los complejos de proteína-fosfolípidos de esta invención se pueden hacer como una mezcla seca o en suspensión acuosa, conteniendo en algunos casos pequeñas cantidades de disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, etanol o trifluoroetanol, detergentes tales como, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio o desoxicolato de sodio, sales tales como cloruro de calcio o cloruro de sodio, hidratos de carbono tales como glucosa, dextrosa o manitol, y aminoácidos tales como glicina y alanina. Cuando la composición farmacéutica se prepara en forma líquida, se pueden añadir estabilizantes, agentes de conservación, reguladores de la presión osmótica, agentes tamponantes y agentes de suspensión del líquido. Si se desea, también se pueden añadir germicidas. El pH de la suspensión acuosa puede variar entre 2 y 10 y se puede ajustar con ácidos y bases tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, fosfato de sodio o hidróxido de sodio. La mezcla seca se puede reconstituir en una solución acuosa que contiene sales farmacéuticamente aceptables, disolventes orgánicos y detergentes. La preparación acuosa se puede dializar, filtrar o cromatografiar para intercambiar el medio de suspensión por un medio farmacéuticamente aceptable antes de su uso. El preparado se puede administrar como un polvo seco, una suspensión acuosa o como un aerosol directamente a los pulmones del enfermo de disnea. La composición farmacéutica de la presente invención se puede cargar en envases cerrados herméticamente tales como viales y ampollas y conservar en condiciones estériles. La composición se puede guardar en un vial o una ampolla distinto de un vial o una ampolla que contiene el tampón de suspensión y la composición seca o hidratada se puede mezclar con el tampón de suspensión antes de su uso.

El lípido constituye de 50 a 99,9 % del preparado de tensioactivo pulmonar. Entre los lípidos adecuados, se incluyen DPPC, PC, CL, PG, PS, FA y TG. DPPC comprende la especie lipídica mayoritaria y está presente en concentraciones de 60 a 100 % del peso total de lípidos. Los lípidos restantes están presentes en concentraciones minoritarias. PC, CL, PG y PS pueden constituir hasta el 30 % de los lípidos y FA y TG pueden constituir hasta el 10 % del peso de lípidos. Las cadenas de acilo graso de los componentes lipídicos minoritarios pueden ser saturadas o insaturadas y de cualquier longitud de cadena. Se prefieren longitudes de cadena de 12 a 16 átomos de carbono y hasta 2 enlaces insaturados. La composición preferida de lípidos es 85-100 % de DPPC más 0-15 % de PG. Lo más preferido es DPPC puro.

Los componentes lipídicos del tensioactivo pulmonar sintético se encuentran corrientemente en el tensioactivo pulmonar sintético y son asequibles a partir de fuentes industriales comunes de alta pureza. Los componentes polipeptídicos se preparan por síntesis de péptidos en fase sólida por métodos familiares para los expertos en la técnica. Se ha demostrado que las mezclas de los lípidos de la invención con proteínas aisladas de lavado pulmonar de mamíferos son eficaces para tratar SDR neonatal. Sin embargo, sólo recientemente se han dado a conocer mezclas de estos lípidos con péptidos sintéticos en preparados de tensioactivo pulmonar (McLean y col.).

Los lípidos se suspenden como liposomas por métodos conocidos por los expertos en la técnica; es decir, métodos que comprenden mezclar inicialmente lípidos en un disolvente orgánico volátil o mezclas de disolventes, tales como mezclas de cloroformo y metanol o trifluoroetanol. El disolvente orgánico se separa por evaporación en nitrógeno, argon o a vacío. A la mezcla seca de lípidos se añade una solución acuosa que puede contener ácidos, bases y sales orgánicos e inorgánicos, y sacáridos tales como dextrosa, para conseguir una concentración final de 0,1 a 100 mg de DPPC por ml. En general, es preferible, pero no necesario, calentar la mezcla a 35-50°C, mezclar enérgicamente e incubar durante hasta 2 horas a 25-50°C. Después, se añade el péptido o una mezcla de péptidos como un polvo seco o suspendido en una solución acuosa que, en algunos casos, contiene un disolvente orgánico adecuado, tal como etanol o trifluoroetano, o un agente desnaturalizante, tal como hidrocloruro de guanidinio o urea, lo que mejora la solubilidad del péptido en la suspensión acuosa. La asociación de péptido y lípido puede ser promovida a un pH particular, así que el pH de la solución acuosa puede variar de 2 a 10. El método preferido para mezclar péptido y lípido es añadir péptido seco al lípido en agua a 45-50°C y mezclar en un baño ultrasónico a 45-50°C durante 30-90 minutos, después liofilizar y conservar la mezcla a -20°C.

Opcionalmente los lípidos se pueden mezclar con un detergente adecuado tal como octilglucósido o desoxicolato de sodio a una relación en peso de 1 a 20 partes de detergente por parte de DPPC en agua, un tampón acuoso, o solución salina a concentraciones de 1 a 100 mg de DPPC/ml. Después, se añade un péptido como un polvo seco o suspendido en solución acuosa con o sin un disolvente orgánico, agente

desnaturalizante o detergente. Después, la mezcla se dializa, filtra, centrifuga o cromatografía para separar el detergente.

Preferiblemente, los lípidos y péptidos se mezclan en un disolvente orgánico volátil con o sin una pequeña cantidad de agua. El disolvente volátil se evapora bajo una corriente de nitrógeno o argon, en una estufa a vacío, o por evaporación rotatoria ya sea antes o después de la adición de un disolvente acuoso.

La mezcla de lípido y péptido preparada por uno de los métodos descritos anteriormente se incuba durante hasta 2 horas, preferiblemente a 35-50°C con irradiación sónica. Después la mezcla se puede dializar, filtrar o cromatografiar para reemplazar el medio acuoso por un medio farmacéuticamente aceptable, aunque esto no es necesario. En algunos casos, se mejora la eficacia separando por ultracentrifugación el lípido o péptido que no ha reaccionado del lípido y péptido asociados. Después la mezcla se puede liofilizar o convertir en aerosol.

Cuando se utilizan los complejos de polipéptido-fosfolípido de esta invención en el tratamiento de síndrome de disnea respiratoria neonatal, una situación fisiológica que se debe a la incapacidad de los pulmones de recién nacidos prematuros para producir tensioactivo pulmonar, los complejos actúan como antioxidante y tensioactivos pulmonares sintéticos y pueden reemplazar al tensioactivo natural que no existe o la deficiencia de tensioactivo natural.

El tratamiento se continúa hasta que los pulmones del recién nacido producen una cantidad suficiente de tensioactivo pulmonar natural que hace innecesario más tratamiento.

Preferiblemente, los preparados son aquellos que resultan adecuados para administración endotraqueal, es decir como una suspensión líquida, un polvo seco o un aerosol. Para una suspensión líquida, la mezcla seca o la mezcla en suspensión acuosa se mezcla con agentes adecuados, tales como agua, soluciones salinas, dextrosa y glicerol para producir una composición farmacéuticamente eficaz. Las suspensiones líquidas preferidas contendrán de 0,8 a 1,0 por ciento en peso de cloruro de sodio y tendrá una concentración 1 - 20 mM, preferiblemente en un medio de iones calcio. Después el preparado se esteriliza por filtración. En general, el preparado comprende de 1 a 100 mg de DPPC por ml y se administra a una dosis de 0,2 a 5 ml/kg. Para preparar una mezcla seca, la suspensión acuosa se liofiliza. El aerosol se prepara a partir de un polvo seco finamente dividido suspendido en un propelente, tal como alcanos inferiores y alcanos fluorados, tales como Freon. El aerosol se almacena en un recipiente presurizado.

Por ejemplo, el tensioactivo (complejo de polipéptido de la presente invención y lípido) se administra, como es apropiado para la forma de dosificación, por incubación endotraqueal, por administración de aerosol o por nebulización de la suspensión o mezcla seca en el gas inspirado. El tensioactivo se administra en una o múltiples dosis de 10 a 200 mg/kg. El método preferido de administración es como una suspensión de péptido y lípido en solución salina fisiológica a una concentración de 5-10 mg de tensioactivo por ml a través de un tubo endotraqueal, consiguiendo una dosis de 50 -100 mg/kg.

El polipéptido de la presente invención se administra para tratar a un paciente. "Paciente" representa un mamífero, por ejemplo, un ser humano, pero sin limitarse a este.

Los siguientes ejemplos muestran algunos métodos de preparación del polipéptido, complejo de polipéptido/lípido y materiales de partida de la presente invención. La presente invención no se limita a los ejemplos siguientes ni a estos métodos de preparación.

Las abreviaturas utilizadas en los ejemplos no definidas previamente son las siguientes:

TBDMS	Tetrabutildimetilsililo
SEt	Etiltio
Suc	Succinilo
TFA	Acido trifluoroacético
Bzl	Bencilo
Ot-Bu	t-butil éter;

que acompañan a la química convencional de Boc y a la química convencional de Fmoc: que es la química utilizada con el sintetizador de péptidos ABI para los ciclos Boc y los ciclos Fmoc, respectivamente.

Procedimientos químicos experimentales

Ejemplo 1

Síntesis de péptidos y otros productos químicos. Los péptidos se sintetizaron en una escala de 0,5 milimoles por métodos de fase sólida en un sintetizador de péptidos modelo 430-A de Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA). Se utilizó resina de p-Metilbenzoxihidrilamina (pMBHA) para dar amidas C-terminales al desanclar el péptido. Los Nα-t-Boc (t-butiloxicarbonil) aminoácidos con protección en las cadenas laterales Cis (etiltio), Glu (bencilo) y Lys (2-clorobenciloxicarbonilo) de Peptides International se copularon doblemente vía sus anhídridos simétricos preformados. El grupo antioxidante se copuló por activación del ácido del antioxidante para formar el anhídrido simétrico. Antioxidantes, tales como HBB (ácido 3,5-di-t-butil-4-hidroxibenzoico) se pusieron en el extremo amino del péptido por preactivación del ácido HBB para formar el anhídrido simétrico correspondiente. En general el antioxidante se copula dos o tres veces para asegurar la reacción completa. Por ejemplo, HBB requería tres copulaciones para conseguir la incorporación completa. Se efectuaron copulaciones adicionales como se determinó en base a ensayos de ninhidrina. Los grupos Na-t-Boc se eliminaron con ácido trifluoroacético (TFA) al 50 % en cloruro de metileno y se neutralizaron con diisopropiletilamina (DEA) al 10 % en dimetilformamida. Los péptidos se desanclaron de la resina y se desprotegieron en HF anhidro que contenía anisol al 5 % y sulfuro de dimetilo al 5 % a -5°C durante 45 min. HF se separó a vacío y el péptido se extrajo de la resina con acetonitrilo acuoso al 50 %. Los extractos combinados se congelaron y liofilizaron y se purificaron por CLAE preparativa en fase reversa en una columna C_{18} (21,4 x 250 mm) de Rainin Dynamax a 40 ml/min con un gradiente de acetonitrilo en TFA acuoso al 0,1 % (pH 2) monitorizada a 214 nm. El pico principal se recogió y liofilizó. La pureza (>97 %) y la identidad de los péptidos sintéticos se confirmaron por un solo pico en el cromatograma de líquidos de alta eficacia (CLAE) analítico, electroforesis de zona capilar, espectrometría de masas por bombardeo de átomos rápidos (EM-BAR) en un instrumento VG Analytical ZAB2-SE que dio iones moleculares aislados concordantes con las secuencias correctas, y análisis de aminoácidos que estaban dentro del 10 % de los valores predichos para cada resto. La L-α -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (>99 % de pureza) era de Avanti Polar Lipids (Birmigngham, AL). Utilizando estos procedimientos se sintetizaron los péptidos siguientes; sus propiedades analíticas se encuentran en la Tabla 1.

1(A) *Preparación del polipéptido*: HBB-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys -NH_2 (SEQ ID N°: 1) (HBB-Aoc = N^{α}-hidroxi-di-t -butilbenzoilaminooctanoil-)

Inicialmente se preparó Aoc - Glu(OBzl) - Trp - Aib - Lys(N^{ε} - 2ClZ) - pMBHA utilizando una resina Lys(N^{ε} - 2ClZ) - pMBHA colocada en el sintetizador de péptidos ABI430A y se sintetizó utilizando química t - Boc convencional. Para sintetizar el péptido 1A, se mezclaron ácido N^{α} - hidroxi - di - t - butilbenzoico (HBB) (501 mg), dimetilformamida (4 ml) y cloruro de metileno (4 ml) y se añadió una solución de diciclohexilcarbodiimida (8 ml de una solución 0,5 M en cloruro de metileno) y la mezcla se agitó durante 5 minutos para dar el anhídrido simétrico de HBB, que después se copuló a Aoc - Glu(OBzl) - Trp - Aib - Lys(N^{ε} - 2ClZ) - pMBHA en un exceso de 10 veces para cada una de dos copulaciones. El péptido protegido HBB - Aoc - Glu(OBzl) - Trp - Aib - Lys(N^{ε} - 2ClZ) - pMBHA se desancló de la resina y los grupos protectores de las cadenas laterales se separaron tratando HBB - péptido - resina en HF anhidro que contenía anisol al 5 % y sulfuro de dimetilo al 5 % a - 5°C durante 1 hora. Después, se extrajo el péptido de la resina con acetonitrilo al 50 % en ácido trifluoroacético al 0,1 %, se congeló y se liofilizó. Después, el péptido se purificó por CLAE en fase reversa para dar el compuesto del título.

1(B). *Preparación del complejo de DPPC con el polipéptido descrito en el ejemplo 1(A)*

Se prepara péptido 1(A) como se ha descrito anteriormente. Se seca DPPC (25 mg) en 1 ml de cloroformo bajo una corriente de nitrógeno y se seca a vacío para eliminar trazas de disolvente orgánico. A la mezcla de lípidos seca se añaden 3 ml de agua. El preparado se incuba durante 1 hora a 45°C. Después, se añaden 0,5 mg de péptido seco 1(A) al preparado acuoso. El preparado se sonica en un baño ultrasónico a 45°C durante 2 horas. La mezcla de lípido-péptido resultante se liofiliza y guarda a 4°C durante un mes a lo sumo. Antes del ensayo, se añaden 9 ml de NaCl al 0,9 %, tampón HEPES 20 mM, pH 7,40. El preparado se incuba durante 1 hora a 45°C con mezcla periódica.

Ejemplo 2

2(A). *Preparación del polipépido*: HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu -Lys-NH_2 (SEQ ID N°: 2) (HBB-Aoc = N^{α}-hidroxi-di-t -butilbenzoilaminooctanoil-)

Se preparó Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Glu(OBzl)-Lys(N^{ε}-2ClZ) -pMBHA utilizando una resina Lys(N^{ε}-2ClZ)-pMBHA colocada en el sintetizador de péptidos ABI430A y se sintetizó utilizando química t-Boc convencional. Para sintetizar el péptido 2A, se mezclaron ácido N^{α}-hidroxi-di-t-butilbenzoico (HBB) (501 mg), dimetilformamida (4 ml) y cloruro de metileno (4 ml) y se añadió una solución de diciclohexilcarbodiimida (8 ml de una solución 0,5 M en cloruro de metileno) y la mezcla se agitó durante 5 minutos para dar el anhídrido simétrico de HBB, que después se copuló a Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Glu(OBzl)-Lys(N^{ε} -2ClZ)-pMBHA en un exceso de 4 veces para cada una de dos copulaciones. El péptido protegido HBB-Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Glu(OBzl)-Lys (N^{ε}-2ClZ)-pMBHA se desancló de la resina y los grupos protectores de las cadenas laterales se separaron tratando HBB-péptido-resina en HF anhidro que contenía anisol al 5 % y sulfuro de dimetilo al 5 % a -5°C durante 1 hora. Después, se extrajo el péptido de la resina con acetonitrilo al 50 % en ácido trifluoroacético al 0,1 %, se congeló y se liofilizó. Después, el péptido se purificó por CLAE en fase reversa para dar el compuesto del título.

2(B). *Preparación del complejo de DPPC con el polipéptido descrito en el ejemplo 2(A)*

El péptido 2 (A) se mezcló con DPPC esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

3(A). *Preparación del polipéptido*: Trl - Aoc - Glu - Trp - Aib - Lys - NH_2 (Trl - Aoc = 6 - hidroxi - 2,5,7,8 - tetrametilcroman - 2 - carboxilaminooctanoil -) (SEQ ID N°: 3)

Se preparó Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Aib-Lys(N^{ε}-2ClZ)-pMBHA utilizando una resina Lys(N^{ε}-2ClZ)-pMBHA colocada en el sintetizador de péptidos ABI430A utilizando química t-Boc convencional.

Para sintetizar el péptido 3A, se mezclaron ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (501 mg), dimetilformamida (4 ml) y cloruro de metileno (2,5 ml) y se añadió una solución de diciclohexilcarbodiimida (8 ml de una solución 0,5 M en cloruro de metileno) y la mezcla se agitó durante 5 minutos para dar el anhídrido simétrico de HBB, que después se copuló a Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Aib-Lys(N^{ε} -2ClZ)-pMBHA en un exceso de 10 veces para cada una de dos copulaciones.

Para desanclar Trl-Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Aib-Lys(N^{ε}-2ClZ) -pMBHA de la resina y eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales, el péptido se trató en HF anhidro, anisol al 5 % y sulfuro de dimetilo al 5 % a -5°C durante 1 hora. Después, se extrajo el Trl-péptido de la resina con acetonitrilo al 50 % en ácido trifluoroacético al 0,1 %, se congeló y se liofilizó. Después, el Trl-péptido se purificó por CLAE en fase reversa para dar el compuesto del título.

3(B). *Preparación del complejo de DPPC con el polipépido descrito en el ejemplo 3(A)*

El péptido 3 (A) se mezcló con DPPC esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 1b.

Ejemplo 4

4(A). *Preparación del polipépido*: HBB-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2 (SEQ ID N°: 4) (HBB = N^{α}-hidroxi-di-t-butilbenzoil-)

El péptido 4(A) se prepara de manera esencialmente análoga a la preparación del péptido 1(A).

4(B) *Preparación del complejo de DPPC con el polipéptido descrito en el ejemplo 4(A)*

El péptido 4 (A) se mezcla con DPPC esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 5

5(A). *Preparación del polipéptido*: HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys -NH_2 (SEQ ID N°: 5) (HBB-Aoc = N^{α}-hidroxi-di-t -butilenzoilaminooctanoil-)

El péptido 5(A) se prepara de manera esencialmente análoga a la preparación del péptido 1(A).

5(B). *Preparación del complejo de DPPC con el polipéptido descrito en el ejemplo 5(A)*

El péptido 5(A) se mezcla con DPPC esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.

TABLA 1

Propiedades analíticas de los péptidos sintetizados análisis por espectrometría de masas-BAR de los péptidos 1-5

SEQ ID N°	Péptido	EM-BAR	AAA
1	HBB-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2	$[M+H]^+$=920,6	@85 %
2	HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys-NH_2	$[M+H]^+$=963,6	@62 %
3	Trl-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2	$[M+H]^+$=920,6	@89 %
4	HBB-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2	$[M+H]^+$=778,97	@78 %
5	HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys-NH_2	$[M+H]^+$=904	@76 %

Preparación de restos antioxidantes

Los siguientes materiales de partida antioxidantes se pueden utilizar como se ha descrito en los ejemplos precedentes.

Ejemplo 6

Preparación de material de partida antioxidante: Acido 3-t-butil-5-metil-4-hidroxibenzoico

Un recipiente de reacción se carga con una suspensión de hidruro de sodio (4,74 g, 0,198 moles) en dimetil éter de etilenglicol anhidro (150 ml). Se añade gota a gota una solución de 2-t-butil-6-metilfenol (0,1 moles) en dimetil éter de etilenglicol (150 ml). La mezcla se calienta a 50-60°C durante 1,5 horas y después se introduce dióxido de carbono a través de un tubo de entrada de gas por debajo de la superficie de la mezcla de reacción durante 20 horas. Se enfría a 5°C y el exceso de hidruro de sodio se destruye cuidadosamente con alcohol metílico (30 ml). Cuando cesa el desprendimiento de hidrógeno, el pH de la mezcla de reacción se ajusta a 2 con ácido clorhídrico 1N. La mezcla se diluye con agua (1,6 litros) y el compuesto del titulo se recoge por filtración.

Ejemplo 7

Preparación de material de partida antioxidante: Acido (6-hidroxi-7-t-butil-5-isopropil-8-propilcroman-2-il)acético

Se mezclan limaduras de magnesio (45 mg, 1,85 mmoles) y 1-cloro-2,2-dimetilpropano (75,6 mg, 0,7 mmoles) en éter anhidro (9 ml). Se calienta y se agita enérgicamente, después se añade gota a gota 1,2-dibromoetano (156 mg, 0,839 mmoles) en éter anhidro (1,5 ml). La mezcla se calienta a reflujo durante 12 horas, se pone en atmósfera de nitrógeno y se enfría a 0-5°C. Se añade gota a gota una solución de cloruro de isobutirilo (0,533 mmoles) en éter dietílico anhidro (1,5 ml). La mezcla se agita a 0-5°C durante 1,5 horas, se vierte en una mezcla de hielo y ácido clorhídrico concentrado (0,15 ml) y se separa la fase orgánica. Se lava con acetato de etilo, carbonato de sodio acuoso al 5 % y salmuera. Se seca ($MgSO_4$) y se evapora el disolvente a vacío para dar 2,2,6-trimetil-4-heptanona.

Se disuelve cloruro de vinilmagnesio (0,7 mmoles) en éter dietílico anhidro (1 ml), se pone en atmósfera de argon y se enfría a 1-5°C. Se añade gota a gota una solución de cloruro de butirilo (0,533 mmoles) en éter dietílico anhidro (1,5 ml). Se agita a 0-5°C durante 1,5 horas, se vierte en una mezcla de hielo y ácido clorhídrico concentrado (0,15 ml) y se separa la fase orgánica. Se lava con agua, carbonato de sodio acuoso al 5 % y salmuera. Se seca ($MgSO_4$) y se evapora el disolvente a vacío para dar propil-vinil-cetona.

Se disuelve 2,2,6-trimetil-4-heptanona (0,4 moles) en metanol (10 ml) y se añade t-butóxido de potasio (12 g, 0,1 moles). Se añade gota a gota una solución de propilvinilcetona (0,2 moles) en metanol (10 ml). Se agita durante 10 minutos y la mezcla de reacción se distribuye entre éter etílico y salmuera. Se separa la fase orgánica y se lava con salmuera hasta neutralidad. Se seca (Na_2SO_4) y se evapora el disolvente a

vacío para dar 2-propil-3-t-butil-5-isopropil -benzoquinona.

Se disuelven 2-propil-3-t-butil-5-isopropilbenzoquinona (10 mmoles), 1,1,3,3-tetrametildisiloxano (1,79 ml, 10 mmoles) y yodo (0,05 g) en cloruro de metileno (30 ml). La solución se agita a reflujo durante 30 minutos y se extrae con hidróxido de sodio 1N (30 ml). La fase acuosa se acidula con ácido clorhídrico concentrado y se extrae en acetato de etilo (4 x 10 ml), se seca (Na_2SO_4) y se evapora el disolvente a vacío para dar 2-propil-3-t-butil-4-hidroxi-5-isopropilfenol.

Se disuelven 2-propil-3-t-butil-4-hidroxi-5-isopropilfenol (2,0 moles) y ortoformiato de trimetilo (0,3 ml) en metanol (1,2 ml) y se desgasifica. La mezcla se pone en atmósfera de nitrógeno y se enfría a 3°C y se añade ácido sulfúrico concentrado (5 ml). Se añade gota a gota metilvinilcetona (340 ml, 4,0 moles) y se agita sin enfriar durante 44 horas. La mezcla se vierte en hidrógeno-carbonato de sodio acuoso y se extrae con éter etílico. El extracto se seca ($MgSO_4$) y el disolvente se evapora a vacío para dar 2-metoxi -2-metil-7-t-butil-5-isopropil-8-propilcroman-6-ol.

Se disuelve 2-metoxi-2-metil-7-t-butil-5-isopropil-8 -propilcroman-6-ol (2 moles) en piridina (600 ml) y se añade anhídrido acético (900 ml). La mezcla se desgasifica y agita en atmósfera de nitrógeno durante 18 horas. Se vierte en hielo/agua y se agita durante 3 horas. Se extrae en éter etílico, se seca ($MgSO_4$), el disolvente se evapora a vacío y el residuo se purifica por cromatografía para dar acetato de 2-metoxi-2-metil-7-t-butil-5-isopropil-8-propilcroman-6-ilo.

Se disuelve acetato de acetato de 2-metoxi-2-metil-7-t -butil-5-isopropil-8-propilcroman-6-ilo (2 moles) en acetona (2,5 litros) y se añade agua (2 litros) seguida de ácido clorhídrico concentrado (16,6 ml). Se destila el disolvente de la mezcla agitada hasta que la temperatura alcanza 90°C. La suspensión se enfría, se diluye con éter etílico y se lava con hidrógeno-carbonato de sodio acuoso. Se seca ($MgSO_4$), el disolvente se evapora a vacío y el residuo se purifica por cromatografía para dar acetato de 2-hidroxi-2-metil-7-t -butil-5-isopropil-8-propilcroman-6-ilo.

Se suspende hidruro de sodio (47,2 g de suspensión al 56 % en aceite mineral, 1,10 moles) en tetrahidrofurano anhidro (1 litro). Se pone en atmósfera de nitrógeno y se añade gota a gota una solución de acetato de 2-hidroxi-2 -metil-7-t-butil-5-isopropil-8-propilcroman-6-ilo (0,5 moles) en tetrahidrofurano (1 litro). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 18 horas y después se calienta a reflujo durante 4 horas. Después se enfría, se evapora el disolvente a vacío y el residuo se purifica para dar el compuesto del título.

Ejemplos biológicos

Los métodos para ensayar la eficacia de los preparados tensioactivos sintéticos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los preparados tensioactivos sintéticos de la presente invención se pueden ensayar de cualquier manera apropiada, tal como el modelo pulmonar de rata adulta (Ikegami y col., (1979) *Pediatr. Res.* 13, 777-780).

Las características de presión-volumen de los pulmones de rata que carecen de tensioactivo son similares a las de los pulmones de lactantes con enfermedad de la membrana hialina y la recuperación de la relación presión-volumen de los pulmones a la normalidad está relacionada con la cantidad de tensioactivo instilado de una manera dependiente de la dosis. (Bermel, M.S. y col.: Pulmones de rata extirpados irrigados como modelo de deficiencia de tensioactivo, *Lung* 162: 99-113 (1984)).

Ejemplo 8

Modelo de pulmón irrigado aislado de rata

Los procedimientos experimentales para preparación de los animales, registro de la curva de presión-volumen e irrigación de los pulmones se adaptan a partir de los descritos por Ikegami y col., *Pediatr. Res.* 11: 178-182 (1977) y *Pediatr. Res.* 13: 777-780 (1979) y Bermel y col., *Lung* 162: 99-113 (1984). Ratas Sprague-Dawley machos (200-250 g) se anestesian con pentobarbital sódico y se desangran. Se canula la tráquea y los órganos torácicos se extirpan en bloque. Después de separar el tejido adventicio, la tráquea y los pulmones (-2 g) se suspenden en solución salina (0,9 %), se ponen en una cámara de vacío y se desgasifican siguiendo el procedimiento de Stengel y col. Los pulmones desgasificados se suspenden en solución salina en un depósito envuelto en una camisa, a 37°C, y la cánula traqueal se conecta a un manómetro de agua y a una jeringa de vidrio mediante un tubo en T. La jeringa de vidrio se pone en una bomba de infusión/ extracción. Los pulmones se inflan rápidamente con aire a una presión de H_2O

de 30 cm a un ritmo de 10 ml/min para minimizar la entrada de aire, y se mantienen a esta presión durante 10 min por adición intermitente de aire a los pulmones. El volumen total de aire infundido se registra como la capacidad pulmonar total (CPT) que generalmente es 14-15 ml. Después se desinflan los pulmones a un ritmo de 2,5 ml/min hasta que se consigue presión cero. Durante el desinflado, se lee la presión en el manómetro de agua a intervalos de 1 cm y se registra. Estos datos se utilizan para construir una curva de presión-volumen (P-V) o cuasi-deformación después de la corrección para la curva P-V del aparato. Después de desgasificar y equilibrar, los pulmones se hacen deficientes en tensioactivo por irrigación repetida con 5 ml/g de tampón de irrigación (NaCl al 0,9 %, HEPES 10 mM, pH 7,4). Los procedimientos de desgasificación, equilibración e irrigación se repiten (15-20 veces) hasta que la curva de presión-volumen ha adquirido forma claramente sigmoidal y el volumen de aire que permanece en los pulmones a una presión de H_2O de 5 cm es menor o igual que 3 ml. En este instante. se considera que los pulmones son deficientes en tensioactivo. Para el ensayo, se añaden 2 ml de NaCl al 0,9 %, 10 ml de tampón HEPES 10 mm, pH 7,4, a los tensioactivos pulmonares secos (25 mg de fosfolípido; 100-125 mg/kg) y la mezcla se somete a vórtice, se lava con nitrógeno y se incuba durante 1 h a 45°C. Después la mezcla se somete nuevamente a vórtice, se desgasifica si ha hecho espuma y se introducen 2 ml de la mezcla de ensayo y se sacan de los pulmones cuatro veces con una jeringa. Cuando la mezcla de ensayo se reintroduce en los pulmones por quinta vez, se deja que permanezca en los pulmones. Se adopta este procedimiento para favorecer la distribución uniforme del material en los pulmones. Los pulmones se desgasifican, se dejan equilibrar a 37°C durante 5 min y se hace una medición de P-V. Los pulmones se estudian mientras están en solución salina a 37°C para contrastar con la temperatura ambiente ya que las características físicas de los tensioactivos pueden ser dependientes de la temperatura. Se administra tensioactivo pulmonar canino de manera similar excepto que el tensioactivo se calienta sólo durante 5 min. Los datos se dan en términos de %CPT. Los limbos de desinflado de las curvas de presión-volumen (P-V) en pulmones de rata adulta se analizan calculando las capacidades pulmonares totales (%CPT) a presiones de 5 y 10 cm de H_2O (PC_5 y PC_{10}). Las comparaciones se basan en el porcentaje de restauración = ($PC_{5(suficiente)}$ - $PC_{5(ensayo)}$) x 100 / ($PC_{5(suficiente)}$ $PC_{5(deficiente)}$) y se hace por análisis mono-modal de varianza utilizando el procedimiento de los modelos lineales generales con contrastes específicos de los valores medios (SAS Institute Inc., Cary, NC). La irrigación y el tratamiento con mezclas de ensayo no produjeron cambios en la CPT absoluta mayores que 6 %.

Resultados

Los preparados administrados a la rata tenían una apariencia translúcida. El limbo de desinflado de la curva de presión-volumen (P-V) en pulmones de rata adulta se analizó calculando el porcentaje de capacidad pulmonar total (CPT) a una presión de 5 cm de H_2O (PC_5) y la CPT a 10 cm de H_2O (PC_{10}). La restauración basada en los valores de PC_5 se utilizó para comparar las mezclas de ensayo. DPPC solo no tuvo ningún efecto significativo sobre las curvas de presión -volumen (P-V) de pulmón irrigado. Las actividades de las mezclas de péptido-DPPC se indican en la Tabla 2.

TABLA 2

Eficacia de tensioactivos sintéticos en el modelo pulmonar irrigado de rata adulta

Mezcla	n	PC_5 (%CPT)	PC_{10} (%CPT)	Restauración %
suficiente	50	68+1	87 ± 1	100
deficiente	50	17 ± 1	45 ± 1	0
DPPC	4	13 ± 1	31 ± 2	11 ± 8
SEQ ID N°: 1 HBB-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2	2	48 ± 5	73 ± 3	65 ± 5

TABLA 2 (Continuación)

Eficacia de tensioactivos sintéticos en el modelo pulmonar irrigado de rata adulta

Mezcla	n	PC_5 (%CPT)	PC_{10} (%CPT)	Restauración %
SEQ ID N°: 2 HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys-NH_2	3	52 ± 2	75 ± 2	83 ± 5
SEQ ID N°: 3 Trl-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2	2	33 ± 2	59 ± 2	43 ± 6
SEQ ID N°: 5 HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys-NH_2	3	55 ± 4	77 ± 2	81 ± 7

Lista de secuencias

(1) INFORMACION GENERAL:

(i) SOLICITANTE: McLean, Larry R.
Edwards, Judson V.

(ii) TITULO DE LA INVENCION: Tensioactivos pulmonares peptídicos sintéticos con antioxidantes covalentemente unidos

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 5

(iv) DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: Marion Merrell Dow Inc.

(B) CALLE: 2110 East Galbraith Rd.

(C) CIUDAD: Cincinnati, P.O. Box 156300

(D) ESTADO: Ohio

(E) PAIS: EEUU

(E) ZIP: 45215-6300

(v) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible

(B) ORDENADOR: IBM PC Compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PAQUETE DE APLICACIONES: PatentIn Release #1.0 versión #1.25

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD EN CURSO:

(A) NUMERO DE SOLICITUD: US

(B) FECHA DE PRESENTACION:

(C) CLASIFICACION:

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:

(A) NUMERO DE SOLICITUD: US 07/923.092

(B) FECHA DE PRESENTACION: 31-JUL-1992

(viii) INFORMACION SOBRE EL PROCURADOR/AGENTE:

(A) NOMBRE: Collier, Kenneth J

(B) NUMERO DE REGISTRO: 34.982

(C) NUMERO DE REFERENCIA/EXPTE.: M01582 US

(ix) INFORMACION PARA TELECOMINICACION:

(A) TELEFONO: (513) 948-7834

(B) TELEFAX: (513) 948-7961

(C) TELEX: 214320

(2) INFORMACION PARA SEQ ID N°:1:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 1

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota=
“Xaa=ácido N - alfa - [N - (8 - hidroxi - di - t - butilbenzoil)aminooctanoil]glutámico (HBB-Aoc-Glu)”

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 3

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota=
“Xaa=ácido 2-aminoisobutírico (Aib)”

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 4

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota= “Xaa=lisin-1-amida”

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°:1:

Xaa Trp Xaa Xaa
1

(2) INFORMACION PARA SEQ ID N°:2:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 1

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota= “Xaa=ácido N - alfa - [N - (8 - hidroxi - di - t - butilbenzoil)aminooctanoil]glutámico (HBB-Aoc-Glu)”

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 4

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota= “Xaa=lisin-1-amida”

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°:2:

Xaa Trp Glu Xaa
1

(2) INFORMACION PARA SEQ ID N°:3:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 1

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota=
“Xaa=N - alfa - [N - (ácido 6 - hidroxi - 2,5,7,8 - tetrametilcroman - 2 - carboxílico)aminooctanoil]”

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 1

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota=
“lo anterior acabado en ácido glutámico (Trl-Aoc-Glu)”

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 4

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota=
“Xaa=ácido 2-aminoisobutírico (Aib)”

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 5

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota=
“Xaa=lisin-1-amida”

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°:3:

```
Xaa Glu Trp Xaa Xaa
1               5
```

(2) INFORMACION PARA SEQ ID N°:4:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 1

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota=
“Xaa=ácido N - alfa - [N - (8 - hidroxi - di - t - butilbenzoil)aminooctanoil]glutámico (HBB-G...”)

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 3

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota= "Xaa=ácido 2-aminoisobutírico (Aib)"

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 4

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota= "Xaa=lisin-1-amida"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°:4:

Xaa Trp Xaa Xaa
1

(2) INFORMACION PARA SEQ ID N°:5:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 1

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota= "Xaa=ácido N - alfa - [N - (8 - hidroxi - di - t - butilbenzoil)aminooctanoil]glutámico (HBB-Aoc-Glu)"

(ix) RASGO CARACTERISTICO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACION: 4

(D) INFORMACION ADICIONAL: /nota= "Xaa=lisin-1-amida"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°:5:

Xaa Trp Ala Xaa
1

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fórmula:

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}Y$$

o uno de sus isómeros ópticamente activos o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; en donde

A_1 es un enlace o un aminoácido cargado negativamente elegido entre Glu o Asp;

A_2 es un aminoácido hidrofóbico elegido entre Trp, Tyr, Phe, His, Val, Leu o Ile;

A_3 es Aib, Glu, Gln, Leu, Ala, Orn o un enlace; y

A_4 es un aminoácido cargado positivamente elegido entre Lys, Arg o His;

X tiene la fórmula Da o Db:

donde B_1 es B, -C(O)-, -B-C(O)-, -C(O)-NH-B-C(O)-; y B es un enlace, alquileno C_{1-16} o alquenileno C_{2-16}; y donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 y R_7 en cada caso son independientemente alquilo C_{1-6};

Y es un sustituyente del carboxilo de A_4 elegido entre grupos hidroxi, amino, alquilamino y alcoxi; y

donde, cuando A_3 es un enlace, A_1 y A_2 se pueden intercambiar.

2. Un polipéptido de fórmula:

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}Y$$

o uno de sus isómeros ópticamente activos o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; en donde

A_1 es un enlace o un aminoácido cargado negativamente elegido entre Glu o Asp;

A_2 es un aminoácido hidrofóbico elegido entre Trp, Tyr, Phe, His, Val, Leu o Ile;

A_3 es Aib, Glu, Gln, Leu, Ala, Orn o un enlace; y

A_4 es un aminoácido cargado positivamente elegido entre Lys, Arg o His;

X tiene la fórmula Da o Db:

donde B_1 es B, -C(O)-, -B-C(O)-, -C(O)-NH-B-C(O)-; y B es un enlace, alquileno C_{1-16} o alquenileno C_{2-16}; y donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 y R_7 en cada caso son independientemente alquilo C_{1-6}; e

Y es un sustituyente del carboxilo de A_4 elegido entre grupos hidroxi, amino, alquilamino y alcoxi.

3. un polipéptido de fórmula:

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}Y$$

o uno de sus isómeros ópticamente activos o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; en donde

A_1 es un enlace o Glu;

A_2 es Trp o Glu;

A_3 es Aib, Glu, Gln, Leu, Ala u Orn; y

A_4 es Lys;

X tiene la fórmula Da o Db:

donde B_1 es B, -C(O)-, -B-C(O)-, -C(O)-NH-B-C(O)-; y B es un enlace, alquileno C_{1-16} o alquenileno C_{2-16}; y donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 y R_7 en cada caso son independientemente alquilo C_{1-6}; e

Y es un sustituyente de 1 carboxilo de A_4 elegido entre grupos hidroxi, amino, alquilamino y alcoxi.

4. Un polipéptido según una de las reivindicaciones 1-3, en que A_1 es Glu.

5. Un polipéptido según una de las reivindicaciones 1-3, en que A_2 es Trp.

6. Un polipéptido según una de las reivindicaciones 1-3, en que A_3 es Aib.

7. Un polipéptido según una de las reivindicaciones 1-3, en que A_3 es Ala.

8. Un polipéptido según una de las reivindicaciones 1-2, en que A_4 es Lys.

9. Un polipéptido según una de las reivindicaciones 1-3, en que X es Da.

10. Un polipéptido según la reivindicación 9 en que cada uno de R_1 y R_2 es t-butilo.

11. Un polipéptido de una de las reivindicaciones 1-10, en que Y es amino.

12. Un polipéptido según una de las reivindicaciones 1-3, que es HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys-NH_2. (SEQ ID N°: °).

13. Un polipéptido según una de las reivindicaciones 1-3, que es HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys-NH_2. (SEQ ID N°: 2).

14. Un polipéptido según una de las reivindicaciones 1-3, que es Trl-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2. (SEQ ID N°: 3).

15. Un polipéptido según una de las reivindicaciones 1-3, que es HBB-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2. (SEQ ID N°: 4).

16. Un polipéptido según una de las reivindicaciones 1-3, que es HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys-NH_2. (SEQ ID N°: 5).

17. Un complejo de un polipéptido de fórmula:

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}Y$$

o uno de sus isómeros ópticamente activos o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; en donde

A_1 es un enlace o un aminoácido cargado negativamente elegido entre Glu o Asp;

A_2 es un aminoácido hidrofóbico elegido entre Trp, Tyr, Phe, His, Val, Leu o Ile;

A_3 es Aib, Glu, Gln, Leu, Ala, Orn o un enlace; y

A_4 es un aminoácido cargado positivamente elegido entre Lys, Arg o His;

X tiene la fórmula Da o Db:

Da o Db

donde B_1 es B, -C(O)-, -B-C(O)-, -C(O)-NH-B-C(O)-; y B es un enlace, alquileno C_{1-16} o alquenileno C_{2-16}; y donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 y R_7 en cada caso son independientemente alquilo C_{1-6};

Y es un sustituyente del carboxilo de A_4 elegido entre grupos hidroxi, amino, alquilamino y alcoxi; y

donde, cuando A_3 es un enlace, A_1 y A_2 se pueden intercambiar; y un lípido o mezcla de lípidos elegidos del grupo formado por DPPC, PC, CL, PG, PS, FA y TG.

18. Un complejo de un polipéptido de fórmula:

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}Y$$

o uno de sus isómeros ópticamente activos o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; en donde

A_1 es un enlace o un aminoácido cargado negativamente elegido entre Glu o Asp;

A_2 es un aminoácido hidrofóbico elegido entre Trp, Tyr, Phe, His, Val, Leu o Ile;

A_3 es Aib, Glu, Gln, Leu, Ala, Orn o un enlace; y

A_4 es un aminoácido cargado positivamente elegido entre Lys, Arg o His;

X tiene la fórmula Da o Db:

donde B_1 es B, -C(O)-, -B-C(O)-, -C(O)-NH-B-C(O)-; y B es un enlace, alquileno C_{1-16} o alquenileno C_{2-16}; y donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 y R_7 en cada caso son independientemente alquilo C_{1-6};

Y es un sustituyente del carboxilo de A_4 elegido entre grupos hidroxi, amino, alquilamino y alcoxi; y un lípido o mezcla de lípidos elegidos del grupo formado por DPPC, PC, CL, PG, PS, FA y TG.

19. Un complejo según la reivindicación 17 o 18, en que DPPC constituye el componente principal del lípido.

20. Un complejo según la reivindicación 17 o 18, en que el lípido es una mezcla de DPPC y PG.

21. Un complejo según la reivindicación 17 o 18, en que el lípido comprende aproximadamente 85-100 % de DPPC y aproximadamente 0-15 % de PG.

22. Un complejo según la reivindicación 17 o 18, en que el polipéptido es HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys-NH_2. (SEQ ID N°: 1).

23. Un complejo según la reivindicación 17 o 18, en que el polipéptido es HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys-NH_2. (SEQ ID N°: 2).

24. Un complejo según la reivindicación 17 o 18, en que el polipéptido es Trl-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2. (SEQ ID N°: 3).

25. Un complejo según la reivindicación 17 o 18, en que el polipéptido es HBB-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2. (SEQ ID N°: 4).

26. Un complejo según la reivindicación 17 o 18, en que el polipéptido es HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys-NH_2. (SEQ ID N°: 5).

27. Uso de un complejo de acuerdo con la reivindicación 17 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del síndrome de disnea respiratoria en un sujeto que lo necesita.

28. Uso de un complejo de acuerdo con la reivindicación 18 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del síndrome de disnea respiratoria en un sujeto que lo necesita.

29. Uso de un complejo de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, donde DPPC constituye el componente principal del lípido.

30. Uso de un complejo de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, donde dicho lípido es una mezcla de DPPC y PG.

31. Uso de un complejo de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, donde dicho lípido comprende aproximadamente 85-100 % de DPPC y aproximadamente 0-15 % de PG.

32. Uso de un complejo de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, donde dicho polipéptido es HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys -NH_2. (SEQ ID N°: 1).

33. Uso de un complejo de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, donde dicho polipéptido es HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys -NH_2 (SEQ ID N°: 2).

34. Uso de un complejo de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, donde dicho polipéptido es Trl-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys -NH_2. (SEQ ID N°: 3).

35. Uso de un complejo de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, donde dicho polipéptido es HBB-Glu-Trp-Aib-Lys-NH_2. (SEQ ID N°: 4).

36. Uso de un complejo de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, en que el polipéptido es HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys -NH_2. (SEQ ID N°: 5).

37. Un procedimiento de preparación de un polipéptido de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

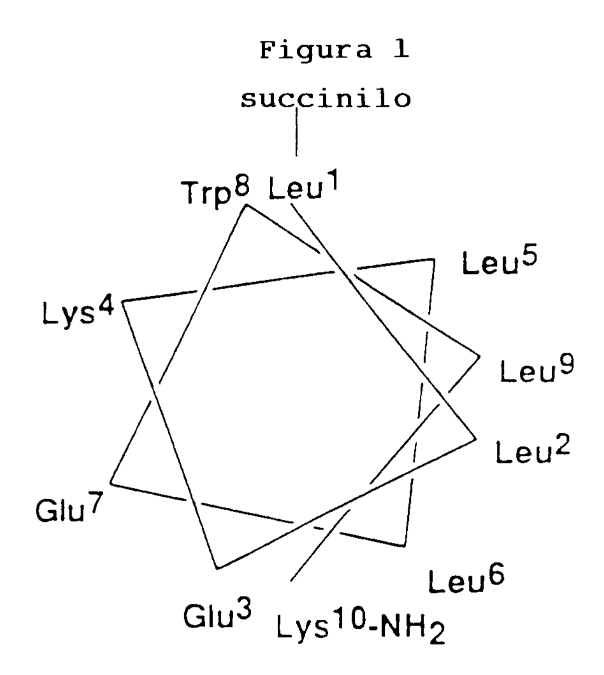
(1) Sintetizar un polipéptido adecuadamente protegido de la fórmula A_1-A_2-A_3-A_4-Y; y después

(2) Hacer reaccionar el extremo alfa amino adecuadamente preparado de A_1-A_2-A_3-A_4-Y por acilación por reacción con un grupo carbonilo activo de B_1 de fórmula X para formar un polipéptido de la forma X-A_1-A_2-A_3-A_4-Y.

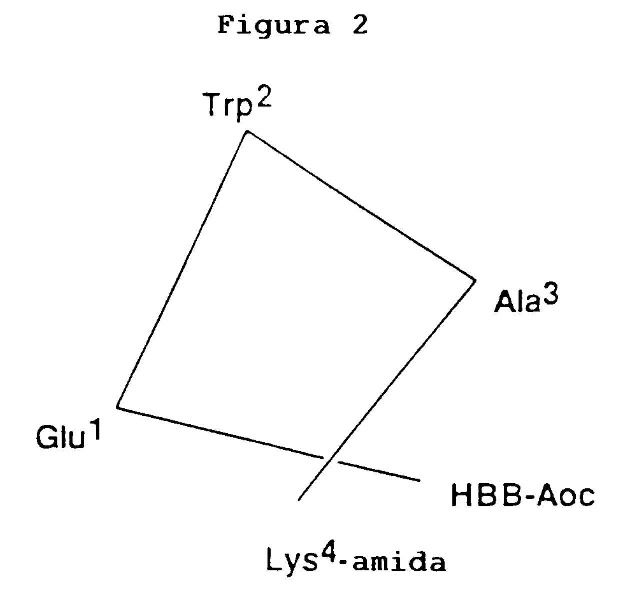
38. Un procedimiento según la reivindicación 37, donde dicho polipéptido es el de las reivindicaciones 12-16.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluída en la mencionada reserva.



succinyl-Leu-Leu-Glu-Lys-Leu-Leu-Glu-Trp-Leu-Lys-NH_2



HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys-NH_2